

(19)

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020030031418 A

(43)Date of publication of application: 21.04.2003

(21)Application number: 1020020061929

(22)Date of filing: 10.10.2002

(30)Priority: 10.10.2001 KR 1020010062315

(71)Applicant: KOREA INSTITUTE OF
ORIENTAL MEDICINE

(72)Inventor: HA, HYE GYEONG
KIM, HYE JIN
KIM, JEONG SUK
LEE, HAN GU
LEE, JE HYEON
SHIN, SEON MI
SONG, GYE YONG

(51)Int. Cl

A61K 35/78

(54) EXTRACT OF MIXED NATURAL DRUGS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING THE SAME FOR PREVENTION AND TREATMENT OF OSTEOPOROSIS

(57) Abstract:

PURPOSE: A pharmaceutical composition containing an extract of mixed natural drugs is provided which has inhibition effect on proliferation of osteoblast and osteoclast is provided . It is effectively used in prevention and treatment of osteoporosis and bone degenerative diseases, and also used as a health supplementary food.

CONSTITUTION: The pharmaceutical composition contains a water, alcoholic or aqueous alcoholic extract of mixed drugs selected from the group consisting of (a)Glycyrrhizae Radix, Astragali Radix, Fructus Jujubae, Lonicera japonica Thunb, Fructus Lycii, Cortex Eucommiae and Cynanchi Wilfordi Radix, (b)Glycine Semen Nigra, Rhynchosia nulubilis Semen, Canavalia gladiata DC. and Dolichoris Semen and (c)Cimicifugae Rhizoma, Fructus Arctii, Folium Mori, Radix Puerariae, Radix Bupleuri, Folium Perillae, Herba Agastachis and Cinnamomi Ramulus.

© KIPO 2003

Legal Status

Date of final disposal of an application (00000000)

Date of registration (00000000)

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

BEST AVAILABLE COPY

(19) 대한민국특허청 (KR)
(12) 공개특허공보 (A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
A61K 35/78

(11) 공개번호 특2003 - 0031418

(43) 공개일자 2003년04월21일

(21) 출원번호 10 - 2002 - 0061929
(22) 출원일자 2002년10월10일

(30) 우선권주장 1020010062315 2001년10월10일 대한민국 (KR)

(71) 출원인 한국 한의학 연구원
서울 강남구 청담1동 129 - 11 청암빌딩 6층

(72) 발명자 김정숙
서울 강남구 압구정1동 현대아파트 24동 102호
이한구
서울특별시송파구풍납동388 - 7우성아파트2동1303호
하혜경
서울특별시도봉구도봉1동555번지서울가든아파트1동408호
김혜진
서울특별시동작구상도2동356 - 107호
신선미
서울특별시서대문구북가좌2동3 - 161그린힐빌라트101호
이제현
서울특별시송파구신천동20번지시영아파트40동407호
송계용
서울특별시서초구방배1동922 - 6

(74) 대리인 이원회

심사청구 : 있음

(54) 혼합 생약재 추출물 및 이를 포함하는 골다공증 예방 또는치료용 약학적 조성물

요약

본 발명은 혼합 생약재 추출물 및 상기 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 감초, 진피, 황기, 대추, 인동, 구기자, 두충, 금은화 및 백하수으로 구성된 군 및 흑두 (또는 대두), 약콩 (귀눈이콩, 서목태), 작두콩 및 백편두로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상을 포함하는 혼합 생약재를 물, 알콜 또는 알콜수용액으로 추출한 추출물 및 상기 혼합 생약재에 승마, 우방자, 상엽 (뽕나무잎), 갈근, 시호, 소엽, 곽향 및 계피로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상 및/또는 녹용을 추가로 첨가한 혼합 생약

재를 물, 알콜 또는 알콜수용액으로 추출한 추출물 및 상기 혼합 생약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 건강식품에 관한 것이다. 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 골다공증, 퇴행성골질환 및 류마티스 관절염과 같은 골질환 등의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 혼합 생약재 추출물 1을 조골세포 유사 세포인 Saos-2 세포에 처리했을 때, 추출물의 농도에 따른 세포의 증식률을 MTT 분석한 것과 ALP(alkaline phosphatase) 활성의 변화를 나타낸 그래프이고,

도 2는 본 발명의 혼합 생약재 추출물 1의 농도에 따른 파골세포의 세포증식 억제 효과를 나타낸 그래프이고,

도 3은 본 발명의 혼합 생약재 추출물 1을 투여한 흰쥐의 자궁 무게를 샴(Sham)군, 17 β -에스트라디올(E2)을 투여한 군 및 대조군 흰쥐의 자궁 무게와 본페로니 다중 비교법으로 비교한 그래프이고,

도 4는 본 발명의 혼합 생약재 추출물 1을 투여한 흰쥐의 경골을 샴(Sham)군, 17 β -에스트라디올(E2)을 투여한 군 및 대조군 흰쥐의 경골과 병리조직학적 관찰로 비교한 사진이고,

도 5는 본 발명의 혼합 생약재 추출물 1을 투여한 흰쥐의 소주골 부위(Trabecular bone area; TBA)를 샴(Sham)군, 17 β -에스트라디올(E2)을 투여한 군 및 대조군 흰쥐의 소주골 부위와 형태계측학적으로 분석한 그래프이다.

도 6은 본 발명의 혼합 생약재 추출물을 SAM P6 생쥐에 투여한 뒤 평균 소주골 면적($\times 10^5 \mu m^2$)을 측정한 그래프이다.

도 7은 본 발명의 혼합 생약재 추출물을 SAM P6 생쥐에 투여한 뒤 전체 소주골 면적($\times 10^5 \mu m^2$)을 측정한 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 혼합 생약재 추출물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 골다공증 예방 및 치료에 효과가 있는 혼합 생약재 추출물에 관한 것이다.

골다공증(osteoporosis)은 골 조직의 석회가 감소되어 뼈의 치밀질이 떨어지고 그로 인해 골수강(骨髓腔)이 넓어지고, 중세가 진전됨에 따라 뼈가 약해지기 때문에 작은 충격에도 골절되기 쉽다. 골량은 유전적 요인, 영양 섭취, 호르몬의 변화, 운동 및 생활 습관의 차이 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받으며, 골다공증의 원인으로는 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소 절제 등이 알려져 있다. 한편 개인차는 있지만 백인보다는 흑인이 골 재흡수 수준(bone resorption level)이 낮아 골량이 더 높으며, 대개 골량은 14~18세에 가장 높고 노후에는 1년에 약 1%씩 감소한다. 특히 여성의 경우 30세 이후부터 골 감소가 지속적으로 진행되며, 폐경기에 이르면 호르몬 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행된다. 즉, 폐경기에 이르면 에스트로젠 농도가 급속히 감소하는데, 이 때 IL-7(interleukin-7)에 의한 것처럼 B-림파구(B-lymphocyte)가 다량 생성되어 골수(bone marrow)에 B 세포 전구체(pre-B cell)가 축적

되고 이로 인해 IL-6의 양이 증가하여 파골 세포의 활성을 증가시키므로 결국 골량이 감소하게 된다.

이와 같이 골다공증은 정도에 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게 있어서는 피할 수 없는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가되고 있다. 또한 전세계적으로 골질환 치료와 관련되어 약 1300억 달러의 시장이 형성되어 있는 것으로 알려져 있으며 앞으로 더 증가할 것으로 예상되기 때문에, 세계적인 각 연구 기관과 제약회사에서는 골질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있다.

현재 골다공증 치료제로 사용되고 있는 물질로는 에스트로젠(estrogen), 앤드로제닉 아나볼릭 스테로이드(androgenic anabolic steroid), 칼슘 제제, 인산염, 불소 제제, 이프리플라본(Ipriflavone), 비타민 D₃ 등이 있다. 또한 1995년 미국 머크사에서는 아미노비스포스포네이트(aminobisphosphonate)를, 1997년 미국 릴리사(Lilly Co.)에서는 선택적인 에스트로젠 수용체 조절기(selective estrogen receptor modulator, SERM)로서의 역할을 하는 라록시펜(raloxifene)을 골다공증 치료제로 개발한 바 있다.

한편, 종래 골다공증 치료제는 대부분 에스트로젠 계통의 물질로서, 에스트로젠 계통의 물질은 장기 투여할 경우 암, 담석, 혈전증 등의 부작용이 나타나는 것으로 알려져 있다. 그러나 골다공증은 약물의 단기 투여만으로는 치료할 수 없으며 약물의 장기 투여가 필수적이다. 따라서 약물을 장기 투여할 때에도 상기와 같은 부작용이 없고 에스트로젠을 대체할 수 있을 만큼 우수한 약효를 갖는 새로운 물질을 개발하고자 하였다.

이에, 본 발명자들은 여러 가지 생약재를 적절히 조합한 생약 추출물이 조골세포를 증식시키고 파골세포의 증식을 억제하는 활성을 나타내어 부작용 없이 골다공증을 예방하고 치료하는데 효과적으로 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 조골세포 증식 및 파골세포 증식 억제 활성을 갖는 혼합 생약재 추출물을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 목적은 상기 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 건강식품을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 조골세포 증식 및 파골세포 증식 억제 활성을 갖는 혼합 생약재 추출물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 건강식품을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 하기 (a)군 및 (b)군에서 각각 선택된 하나 또는 그 이상으로 구성된 혼합 생약재를 물, 알콜 또는 알콜수용액으로 추출한 추출물을 제공한다.

(a) 감초, 진피, 황기, 대추, 인동, 구기자, 두충, 금은화 및 백하수오;

(b) 흑두(또는 대두), 약콩(쥐눈이콩, 서목태), 작두콩 및 백편두.

상기에서, 혼합 생약재는 하나 또는 그 이상의 하기 (c)군의 생약재 및/또는 녹용을 추가로 포함할 수 있다.

(c) 송마, 우방자, 상엽(뽕나무잎), 갈근, 시호, 소엽, 팍향 및 계피.

본 발명에서는 상기 각 군으로부터 임의로 조합한 모든 혼합 생약재를 추출한 추출물을 제공한다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 각각 1) 감초, 흑두 및 승마, 2) 황기 및 약콩, 3) 황기 및 녹용, 4) 황기, 백하수오, 약콩, 녹용 및 계피, 5) 황기, 백하수오, 약콩 및 계피, 6) 황기, 약콩 및 계피, 7) 황기, 백하수오 및 약콩, 8) 황기, 약콩, 백편두 및 계피 및 9) 황기, 백하수오, 약콩, 백편두 및 계피로 구성된 혼합 생약재를 물, 알콜 또는 알콜수용액으로 추출한 추출물을 제공한다.

또한, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 상기 혼합 생약재의 바람직한 혼합비로서 1) 감초 2 중량부, 흑두 2 중량부 및 승마 1 중량부, 2) 황기 5 중량부 및 약콩 5 중량부, 3) 황기 5 중량부 및 녹용 5 중량부, 4) 황기 4 중량부, 백하수오 4 중량부, 약콩 4 중량부, 녹용 1 중량부 및 계피 0.5 중량부 5) 황기 4 중량부, 백하수오 4 중량부 및 약콩 4 중량부, 계피 0.5 중량부 6) 황기 8 중량부, 약콩 8 중량부 및 계피 1 중량부, 7) 황기 1 중량부, 백하수오 1 중량부 및 약콩 1 중량부 8) 황기 8 중량부, 약콩 8 중량부, 백편두 8 중량부 및 계피 1 중량부 및 9) 황기 8 중량부, 백하수오 8 중량부, 약콩 8 중량부, 백편두 8 중량부 및 계피 1 중량부로 혼합하였다.

본 발명에서는 상기 혼합 생약재를 물, 알콜 또는 알콜수용액을 사용하여 추출한다. 상기에서 알콜 수용액은 5 내지 100%의 에틸알콜(ethyl alcohol), 5 내지 100%의 메틸알콜(methyl alcohol) 및 주정으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

본 발명의 혼합 생약재 추출물은 조골세포를 증식시키고 파골세포의 증식을 억제하는 활성을 갖고 있기 때문에 골다공증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

상기 (a)군의 감초, 진피, 황기, 대추, 인동, 구기자, 두충, 금은화 및 백하수오는 보익 약재로서 해독 또는 기력 증진 작용을 하고 타 약물과의 조화가 쉽다.

감초(甘草; 라틴명 *Radix Glycyrrhizae*, 학명 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., 과명 Leguminosae)는 신농본초경(神農本草經)에 최초로 기록된 한약재로, 신농본초경에는 오장육부의 질병에 감초를 사용하며, 감초는 살을 찌우며(長肌肉) 기력을 증진시키고 상처를 낫게 하고 해독작용이 있다고 기록되어 있다. 그밖에 명의별록(名醫別錄)에는 속을 따듯하게 하고 숨이 차고 답답한 것과 내부의 기능이 원활하지 못하여 발생하는 해수에 사용하며 갈증을 멈추고 경맥(經脈)이 잘 소통하게 하며 기혈(氣血)을 이롭게 하며 해독작용을 한다고 하였다. 동의보감(東醫寶鑑)에는 감초가 다른 한약재와 사용하여 약효를 융화시키고 보조하는 작용을 한다고 하였다. 감초는 뿌리와 주출경을 그대로 또는 주피를 제거한 것을 사용하고, 대한약전, 중국약전, 일본약국방에 수록되어 있다. 감초는 간카오닌(Gancaoanin), p-하이드록시벤조산(p-Hydroxybenzoic acid), 스코포레틴(Scopoletin), 글리시롤(Glycyrol), 글리시쿠마린(Glycycomarin), 리코쿠마론(Licocoumarone), 리코벤조푸란(Licobenzofuran) 등의 화학성분이 함유되어 있다.

진피(陳皮; 라틴명 *Pericarpium Citri*, 학명 *Citrus unshiu* MARKOVICH, 과명 Rutaceae)는 신농본초경(神農本草經)에 최초로 기록된 한약재로 소화불량, 식욕부진, 구토, 딸국질, 가래 등에 사용하며 타 한약과 함께 사용하여 약효를 조화시키고 약력을 증가시킨다. 진피의 성분으로는 d-리모닌(d-limonene), 헤스페리딘(hesperidin), 미오이노시톨(myo-inositol), 비타민 C 등을 함유하고 있으며 flavonoid 배당체를 많이 함유하고 있다.

황기(라틴명 *Astragal Radix*, 학명 *Astragalus membranaceus* Bunge, 콩과)는 대표적인 보기제로 사용되며, 이외에도 면역계에 대해 백혈구수 증가, 노화억제, 강심작용, 혈소판응집을 억제하는 작용 등이 있다. 성분으로는 astragaloside I, II, IV, soyasaponon I, formononetin, palmitic acid, linoleic acid, astraglan I, II, III 등이 알려져 있다.

대추(大棗; 라틴명 *Fructus Jujubae*, 학명 *Zizyphus jujuba* MILL., 과명 *Rhamnaceae*)는 신농본초경(神農本草經)에 최초로 기록된 한약재로 소화기 허약, 설사, 기혈의 부족, 가슴의 두근거림, 불안증 등에 사용하며, 한약의 부작용을 예방한다. 대추의 성분으로는 단백질과 당류, 비타민 A, B₂, C와 칼슘, 인등을 함유하고 있다.

인동(忍冬; 라틴명 *Caulis Lonicerae*, 학명 *Lonicera japonica* THUNB., 과명 *Caprifoliaceae*)은 신농본초경집주(神農本草經集注)에 최초로 기록된 한약재로 인플루엔자나 감염증, 중기, 저린 증상, 관절염 등에 사용한다. 인동의 성분으로는 리노세린(linocerin) 등의 flavonoid 류와 탄닌, 알칼로이드 등이 함유하고 있다.

구기자(枸杞子; 라틴명 *Fructus Lycii*, 학명 *Lycium chinensis* MILL., 과명 *Solanaceae*)는 신농본초경(神農本草經)에 최초로 기록된 한약재로 간(肝)과 신(腎)의 허약을 보하는 약으로 요통, 관절통, 어지러움증, 눈이 침침한 증상, 소모성 기침, 소갈(消渴) 등에 사용한다. 구기자의 성분으로는 카로텐(carotene) 3.39 mg%, 비타민 B1 0.23 mg%, 비타민 B2 0.33 mg%, 니코틴산 1.7 mg%, 비타민 C 3 mg%와 베타-시토스테롤(β -sitosterol), 리놀릭산(linoleic acid)를 함유하고 있다.

두충(라틴명 *Cortex Eucommiae*, 학명 *Eucommia ulmoides* OLIV., 과명 *Eucommiaceae*)는 신농본초경(神農本草經)에 최초로 기록된 한약재로 요통과 관절의 허약에 사용하며 소변 잔뇨감, 임신 자궁 출혈, 유산 예방, 고혈압 등에 사용한다.

두통의 성분으로는 구타페르카(gutta-percha)가 6-10% 함유되어 있고 비타민 C 20.7 mg%, 알칼로이드 0.066 mg%, 펙틴(pectin) 6.5 mg% 등을 함유하고 있다.

금은화(金銀花; *Flos Lonicerae*, 학명 *Lonicera japonica* THUNB., 과명 *Caprifoliaceae*)은 명의별록(名醫別錄)에 최초로 기록된 한약재로 염증, 단독(丹毒), 감염성 이질, 열성질환 등에 사용한다. 금은화의 성분으로는 루테올린(luteolin), 이노시톨(inositol), 사포닌, 탄닌 등을 함유하고 있다.

백하수오(白何首烏; 라틴명 *Rhizoma Cynanchum*)은 우리나라에서 전통적으로 하수오의 대용품으로 사용한 한약으로 이제마의 동의수세보원(東醫壽世保元)에서 사상체질의 소음인 약물로 분류하여 적백하오관중탕(赤白何烏寬中湯)이나 적백하오이중탕(赤白何烏理中湯) 등에서 자주 사용하고 있다. 백수오는 자양강장성 보혈약으로 머리를 검게 하고 만성의 저린 증상, 관절통, 성기능 저하, 치질, 장출혈, 잘 낫지 않는 종기 등에 사용한다. 백수오의 성분으로는 사르코스틴(sarcostin), 데아실메타플렉시게닌(deacylmetaplexigenin), 리놀레인(linolein), 키드졸라닌(kidjolanin), 카우다틴(caudatin), 페뉴포게닌(penupogenin) 등을 함유하고 있다.

또한, 상기 (b)군의 흑두(또는 대두), 약콩(귀눈이콩, 서목태), 작두콩 및 백편두는 보신(補腎)작용(腎主骨)을 하고 오장(五臟)의 기능을 촉진하는 작용이 있다.

흑두(黑豆; *Semen Glycine Nigrae*, 학명 *Glycine max* Merr. (*Leguminosae*))는 신농본초경(神農本草經)에 최초로 기록된 한약재로, 흑두를 달여서 마시면 기이한 독을 없애고 통증을 멎는다고 하였으며, 명의별록(名醫別錄)에서는 부종을 내려주고 속이 쓰리고 더부룩한 것과 기능성의 배뇨시 통증과 장애에 사용하고 어혈과 오장(五臟)의 기능이 차서(寒) 경직된 것을 풀어주는 작용을 하고 오두(한약재의 하나)의 독을 제거하며 볶아서 가루로 만들어 속에 열이 많은 것과 저리고 부은 것, 복창(腹脹)과 소화에 사용한다고 하였다. 본초강목(本草綱目)에는 신장(腎臟)의 병을 치료하고 수기(水氣)를 이롭게 하고 기를 내려주며 모든 풍열(風熱)의 질환에 사용하고 혈(血)을 활성화하고 약물의 독성을 해독한다고 하였다. 또한 본초강목(本草綱目)의 부방(附方)에서 식용하면 살이 찌고 기력을 증진시키고 허약한 것을 보익한다고 하였다. 동의보감(東醫寶鑑)에는 속을 조화하고 기를 내려주며 관맥(關脈)을 소통하는 작용을 하며 이 약은 신장(腎臟)에 이로운 곡물고 신장(腎臟)의 병에는 적당한 음식이라고 하였다. 흑두의 기원은 콩(검은 콩)으로 한국생약규격집에 수록되어 있다. 흑두는 크게 이소플라본(isoflavone)류와 사포닌(saponin)류의 화학성분을 주로 함유하고

있고, 제니스테인(genistein)과 다이드제인(daidzein)을 미량 함유하고 있다.

약콩은 서리태 혹은 쥐눈이콩이라고도 불리우며 흑두에 준하는 효능 및 성분을 가진다.

작두콩(도두(刀豆); 학명 *Canavalia gladiata* DC.)은 한해살이 덩굴성 식물의 종자이다. 딸꼭질, 구토, 복통, 이질, 백일해, 축농증 등을 치료한다. 비장을 튼튼히 한다. 성분으로는 urease, hemagglutinine, canavanine 등이 함유되어 있다.

백편두(白扁豆; 라틴명 *Dolichos Semen*, 학명 *Dolichoris lablab* L., 과명 Leguminosae)는 흰색의 말린 종자로 둥근 달걀모양이다. 비위를 튼튼히 하고 중초를 조화시키며 더위를 억제하고 수분을 감소시키는 효능이 있다. 구토, 설사 등으로 인한 식욕감퇴 등을 치료한다. 맛은 달고 성질은 약간 따뜻하다. 백편두의 성분으로는 단백질 0.227%, 지방 0.018%, 탄수화물 0.57%와 칼슘, 인, 아연, 철분 등을 함유하고 있으며, 트립신 저해제(trypsin inhibitor), 아밀라제 저해제(amylose inhibitor), 적혈구 응집소 A, B가 함유되어 있다.

또한, 상기 (c)군의 승마, 우방자, 상엽(뽕나무잎), 갈근, 시호, 소엽, 곽향 및 계피는 양기를 상승시키는 작용이 있다.

승마(升麻, 라틴명 *Rhizoma Cimicifugae*, 학명 *Cimicifuga heracleifolia* Kom., 과명 Ranunculaceae)는 명의별록(名醫別錄)에 최초로 기록된 한약재로, 명의별록에는 돌림병, 기생충질환, 복통, 유행성 질환, 두통, 종양, 후두(喉頭)통, 구내염에 승마를 사용하며, 승마를 장복하면 오래 살 수 있다고 기록되어 있다. 그밖에 본초강목(本草綱目)에는 반진(斑疹)을 없애주고 어혈(瘀血)을 치료하여 양기(陽氣)가 원활하지 못하여 발생하는 어지러움증, 가슴과 옆구리의 통증, 잦은 설사와 후증, 대하, 자궁출혈, 소변에 피가 섞여 나오는 증상, 성기능 장애와 발이 찬 증상에 사용한다고 하였다. 동의보감(東醫寶鑑)에는 승마의 작용에 대하여 원기가 부족한 때에 사용하면 양기를 북돋아 주는 작용을 한다고 하였다. 승마의 사용부위는 지하경이고 대한약전, 중국약전에 수재되어 있다. 승마는 이소페룰산(Isoferulic acid), 시미게놀(Cimigenol), 3-O-β-D-자일로피라노실 시미제니올(3-O-β-D-Xylopyranosyl cimigeniol), 아세틸셀그마놀 자일로사이드(Acetylshengmanol xyloside), 25-안하이드로시미제놀(25-Anhydrocimigenol), 아세리놀(Acerinol) 등의 화학성분을 포함하고 있다.

우방자(牛蒡子; 라틴명 *Fructus Arctii*, 학명 *Arctium lappa* L., 과명 Compositae)는 명의별록(名醫別錄)에 최초로 기록된 한약재로 풍열(風熱)로 인한 감기와 가래가 많은 감기, 열성 질환의 발진, 인후부의 통증에 사용한다. 우방자에는 아르틴(arctiin)과 지방유가 25-30% 함유되어 있으며, 아르틴(arctiin)은 가수분해에 의하여 아르티게닌(arctigenin)과 포도당을 생성한다.

상엽(桑葉; 라틴명 *Folium Mori*, 학명 *Morus alba* L., 과명 Moraceae)은 신농본초경(神農本草經)에 최초로 기록된 한약재로 풍열(風熱)로 인한 감기와 기침, 두통과 눈의 충혈에 사용한다. 상엽에는 루틴(rutin), 쿠에르세틴(quercetin), 이소쿠에르세틴(isoquercetin), 모라세틴(moracetin), 미량의 베타-시토스테롤(β-sitosterol), 캄페스테롤(campesterol), 루페올(lupeol), 마이오이노시톨(myoinositol) 0.18%, 인코스테론(inkosterone) 등의 화학성분이 함유되어 있으며, 비타민 C 200-300 mg%, 글루타치온(glutathione) 140-400 mg, 엽산 105 μg%, 폴리닌산(folinin) 22 μg%, 비타민 B1 460 μg%, 비타민 B2 300-800 μg%, 동 10 ppm, 아연 16 ppm, 붕소 35 ppm, 망간 270 ppm 등이 함유되어 있다.

갈근(葛根; 라틴명 *Radix Puerariae*, 학명 *Pueraria thunbergiana* BENTH., 과명 Leguminosae)은 신농본초경(神農本草經)에 최초로 기록된 한약재로 감기와 갈증, 소갈(消渴), 발진성 질환, 설사, 고혈압으로 인한 뒷목의 불편감 등에 사용한다. 갈근에는 이소플라본(isoflavone) 성분의 푸에라린(puerarin), 푸에라린 자일로사이드(puerarin xyloside), 다이드제인(daidzein), 베타-시토스테롤(β-sitosterol), 아라킨산(arackin), 전분 등이 함유되어 있다.

시호(柴胡; 라틴명 *Radix Bupleuri*, 학명 *Bupleurum falcatum* L., 과명 *Umbelliferae*)는 신농본초경(神農本草經)에 최초로 기록된 한약재로 감기와 발열이 반복되는 증상, 흉부의 불편감, 입이 쓴 증상, 두통, 어지러움증, 학질, 탈항, 월경부조, 자궁하수, 탈장 등에 사용한다. 시호에는 부플레루몰(bupleurumol), 올릭산(oleic acid), 리놀릭산(linoleic acid), 팔미틱산(palmitic acid), 사이코사포닌 A B C(saikosaponin A, B, C), 사이코게닌 F E G(saikogenin F, E, G) 등이 함유되어 있다.

소엽(蘇葉; 라틴명 *Folium Perillae*, 학명 *Perilla frutescens* L., 과명 *Labiatae*)는 신농본초경집주(神農本草經集注)에 최초로 기록된 한약재로 감기와 오한, 발열, 기침, 흉복의 창만(脹滿), 임신부의 유산방지, 게나 어류의 소화 촉진 등에 사용한다. 소엽에는 페릴알데히드(perillaldehyde), ι -리모넨(ι -limonene), 알파-피넨(α -pinene), 알기닌(arginine), 쿠믹산(cumic acid) 등이 함유되어 있다.

박향(藿香; 라틴명 *Herba Agastache*, 학명 *Agastache rugosa* O. Kuntze)와 광박향(廣藿香; 라틴명 *Herba Pogostemonis*, 학명 *Pogostemon cablin* BENTH.)는 명의별록(名醫別錄)에 최초로 기록된 한약재로 오심(惡心) 구토와 권태무력감, 소화불량, 구토설사, 콧물, 두통 등에 사용한다. 박향의 성분으로는 메틸카비콜(methylchavicol)이 80% 이상을 차지하고 아네톨(anethole), 아니스알데히드(anisaldehyde), 알파-리모넨(α -limonene), 알파-피넨(α -pinene) 등을 함유하고 광박향은 파출리알콜(patchouli alcohol)이 정유의 52-57%를 차지하고 에게놀(eugenol), 시나믹알데히드(cinnamic aldehyde), 파고스톨(pagostol) 등을 함유한다.

계피(桂皮; 라틴명 *Ramulus Cinnamomi*, 학명 *Cinnamomum cassia* PRESL., 과명 *Lauraceae*)는 신농본초경(神農本草經)에 최초로 기록된 한약재로 양기가 허약한 증상과 복통설사, 몸이 찬 증상, 관절통증, 월경불순 등에 사용한다. 계피의 성분으로는 신나믹알데히드(cinnamic aldehyde)가 정유의 75-90%를 차지하고 있다.

또한, 녹용(Cervus Cornu)은 대표적인 동물성 한약으로 매화록(*C. nippon* Swinhoe) 또는 마록(*C. elaphus* Milne-Edwards) 및 동속 근연 동물(사슴과 Cervidae)의 털이 밀생되고 골질화 되지 않은 어린 뿔로 정의하고 있다(대한약전). 녹용의 작용은 장원양(壯元陽) 보기혈(補氣血) 익정수(益精髓) 강근골(強筋骨)의 효능을 가지고 있어 기력이 보강하며 몸과 정신력을 강건하고 보신익정수(補腎益精髓)의 효능으로 임상에서 널리 사용되고 있다. 특히 본초강목에서는 정기부족(精氣不足)을 항진시키고 혈허(血虛)를 충족시키는 것으로 기록되어 있다. 사슴뿔의 성장에 미치는 영향으로는 뿔 성장 자극 물질(Antler Growth Stimulant: AGS)이 있으며, 테스토스테론(testosterone)을 포함한 남성 호르몬의 변화와 밀접한 관계를 가진다고 알려져 있고, 프로락틴(prolactin), 테스토스테론(testosterone), 성장호르몬(growth hormone), IGF-I, 티록신(thyroxine, T_4) 등이 녹용의 성장에 크게 영향을 준다고 알려져 있다(Han et al., 1994, pilose Antler, Hanrimwon Publ., Seoul, Korea).

본 발명의 혼합 생약재 추출물이 조골세포(osteoblast)의 증식에 미치는 영향을 알아본 결과, 조골세포에 대하여 우수한 증식 효과가 있음을 확인하였다. 또한 종래 골다공증 치료제로 사용되고 있는 NaF, 17β -에스트라디올(이하 "E2"라 약칭한다)에 비하여 조골세포 증식률이 더 우수하다. 또한, 조골세포는 ALP(alkaline phosphatase) 활성을 나타내므로, 본 발명의 혼합 생약재 추출물이 조골세포에서 ALP 활성에 미치는 영향을 알아본 결과, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 조골세포에 대하여 우수한 ALP 활성률을 나타내고, 종래 골다공증 치료제로 사용되고 있는 E2에 비하여 ALP 활성률이 더 우수하다(도 1 참조).

또한, 본 발명의 혼합 생약재 추출물이 파골세포(osteoclast)의 증식 억제에 미치는 영향을 알아본 결과, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 파골세포의 세포증식 억제 효과가 있는 것으로 나타났다(도 2 참조). 따라서, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 조골세포의 활성을 증가시키고 동시에 파골세포의 활성을 억제하는 것으로 나타나 골다공증의 예방 및 치료제로서 이상적인 제제임을 확인하였다.

본 발명의 혼합 생약재 추출물을 폐경기 이후 타입 I(type I) 골다공증이 일어나는 SD(Sprague - Dawley) 계 흰쥐를 대상으로 하여 골다공증에 대한 동물 실험을 수행하였다. 샴(sham)군은 난소 적출을 제외한 모든 수술을 행한 동물들로 난소를 적출하고 약물 투여를 하지 않은 대조군에 대한 비교군으로 난소 적출로 인한 변화를 대조군과 비교하였다. 난소를 적출하고 나서 1주 후부터 샴군과 대조군은 음용수를 경구투여하였고, E2군은 17 β - 에스트라디올을 복강주사하였으며, 생약 투여군은 본 발명의 혼합 생약재 추출물을 경구투여하고, 각 실험동물의 체중을 매주 측정하고 일정기간 투여 후 조직무게를 측정하여 난소 적출을 제외한 모든 수술을 행한 샴군 및 난소를 적출하고 약물 투여를 하지 않은 대조군의 체중 및 조직무게와 비교한 결과, 샴군과 E2가 투여된 실험군에서는 약물투여 기간 동안 대조군에 비하여 체중의 증가가 현저하게 낮은 반면, 본 발명의 혼합 생약재 추출물을 투여한 실험군에서는 대조군과 거의 동일한 양상으로 체중이 증가되었음을 알 수 있다 (표 7 참조). 상기와 같은 결과는 난소 적출 상태에서는 주령의 증가에 따라 체중이 급격히 증가하며, 본 발명의 혼합 생약재 추출물의 투여가 난소적출 후 주령 증가에 따른 체중의 증가에 아무런 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 또한, 각 군의 실험동물에서 자궁을 제외한 모든 조직들의 무게는 별다른 차이를 나타내지 않았으나, 자궁의 무게는 샴군과 E2 투여군에서는 대조군에 비하여 증가된 반면 혼합 생약재 추출물 투여군에서는 대조군과 거의 유사하였다(도 3 참조). 각 군의 실험동물에서 골조직 간에 병리학적인 차이는 관찰되지 않았으므로 시험 약물의 투여로 인한 생체 내 독성은 없는 것으로 판단되었다(도 4 참조). 또한, 난소를 적출한 대조군은 정상 상태(샴군)에 비해 소주골의 면적이 50% 정도 감소되었고, 이는 골다공증이 유발되었음을 나타낸다(도 5 참조). 난소 적출로 인한 소주골 면적은 E2나 본 발명의 혼합 생약재 추출물의 투여로 인해 증가되었는데, 정상군인 샴군에 비해서는 낮았으나 대조군에 비해서는 유의성 있게 증가하였다. 본 발명의 혼합 생약재 추출물의 투여는 대조군에 비해 소주골의 면적을 증가시켰다(도 5, 도 6 및 도 7 참조). 따라서 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 골다공증의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상기 혼합 생약재 추출물을 유효 성분으로 함유한다. 상기 혼합 생약재 추출물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 혼합 생약재 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다.

혼합 생약재 추출물의 유효용량은 10 내지 1,000 mg/kg이고, 바람직하기로는 30 내지 3,000 mg/kg이며, 하루 1 - 6 회 투여될 수 있다.

본 발명의 혼합 생약재 추출물을 랫트에 경구 투여, 복강 내 투여시 및 피하 주사시의 독성 실험을 수행한 결과, 경구 투여 독성시험에 의한 50% 치사량(LD₅₀)은 적어도 물 추출물 10 g/kg 이상인 안전한 물질로 판명되었다.

또한, 본 발명은 상기 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 건강식품을 제공한다.

혼합 생약재 추출물을 함유하는 건강 식품으로는 혼합 생약재를 주성분으로 만든 즙, 차, 젤리, 주스 등의 건강식품 및 기호품을 들 수 있으며, 보혈제, 보양제, 노화방지제, 근골강화제 등을 목적으로 하는 민간 요법제 등을 들 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

< 실시예 1> 혼합 생약재 추출물 1의 제조

승마, 감초 및 흑두를 1:2:2 중량비로 하여 섞은 후, 이들 혼합 생약재의 분말 1.5 kg을 70% 메탄올 수용액 3ℓ 에 넣고 실온에서 2일 동안 교반시켰다. 2일 후 상기 용액을 거름종이로 여과한 후 이 과정을 3회 반복하였다. 여과액은 감압 농축하여 메탄올을 제거한 뒤 동결 건조하여 수분을 제거하여 혼합 생약재 추출물을 얻었다.

< 실시예 2 - 실시예 9> 혼합 생약재 추출물의 제조 2 - 9

본 발명자들은 하기와 같이 생약재를 혼합하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 혼합생약재 추출물 2 내지 9를 제조하였다(표 1).

[표 1]

	생약재	중량비
추출물 2	황기+약콩	1:1
추출물 3	황기+녹용	1:1
추출물 4	황기+약콩+백하수오+계피+녹용	4:4:4:0.5:1
추출물 5	황기+약콩+백하수오+계피	4:4:4:0.5
추출물 6	황기+약콩+계피	8:8:1
추출물 7	황기+약콩+백하수오	1:1:1
추출물 8	황기+약콩+백편두+계피	8:8:8:1
추출물 9	황기+약콩+백편두+백하수오+계피	8:8:8:8:1

< 실험예 1> 조골세포 증식 분석

본 발명자들은 상기 실시예 1 내지 실시예 9에서 제조한 혼합 생약재 추출물이 조골세포(osteoblast)의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

< 1-1> 조골세포의 선별 및 세포 배양

뼈의 구성 성분인 조골세포와 유사한 성질을 나타내는 MG-63 세포주 및 Saos-2 세포주를 서울대학교 의과대학 암 연구소의 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다.

MG-63 세포는 10% FBS, 페니실린 100 유닛/ml, 스트렙토마이신 100 µg/ml를 포함하는 DMEM 배지(Gibco BRL, 미국)를 사용하였고, Saos-2 세포는 10% FBS, 페니실린 100 유닛/ml, 스트렙토마이신 100 µg/ml를 포함하는 RPMI 1640배지(Gibco BRL, 미국)를 사용하여 습식 조건에서 37℃로 5% CO₂ 배양기(incubator)에서 배양하였다. 배지는 1주일에 2~3회 교환하였고 1주일에 1회 계대배양하였다.

< 1-2> 추출물의 농도에 따른 세포 증식 실험 : MTT 실험

상기 실험에 < 1-1> 에서 배양한 Saos-2 세포주 또는 MG-63 세포주를 96-웰 플레이트에 접종하고, 본 발명의 혼합 생약재 추출물 1 내지 추출물 9를 건조약재해당 $2 \sim 2 \times 10^{-7}$ mg/ml의 농도가 되도록 각 농도별로 6개의 웰에 첨가하였다. 대조군으로는 추출물을 첨가하지 않은 것을 사용하였고, Saos-2 세포주 또는 MG-63 세포주에서의 비교군으로는 현재 골다공증 치료제로 주로 사용되고 있는 NaF, 17β -에스트라디올(이하, "E2"라 약칭한다) 및 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 등을 사용하였다.

상기에서 세포주를 37℃ 배양기에서 3일간 배양하고, 여기에 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Triazolyl Blue)를 0.05 mg/ml 농도로 가하여 같은 조건에서 4시간 더 배양하였다. 생성된 포르마잔(formazan) 결정을 DMSO로 용해시켜 엘리자 판독기(ELISA reader)로 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

세포 증식율(%)은 추출물을 첨가하지 않은 대조군 웰의 흡광도에 대한 추출물 첨가 웰의 흡광도의 비(%)로서 계산하였다(표 2; Saos 세포, 표 3; MG-63 세포).

그 결과, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 Saos-2 세포와 같은 조골세포 유사 세포에 대하여 우수한 증식율을 나타내었고, 종래 골다공증 치료제로 사용되고 있는 NaF, E2 및 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 에 비하여 조골세포 증식율이 더 우수하였다(표 2 및 도 1). 또한, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 MG-63 세포와 같은 조골세포 유사 세포에 대해서도 우수한 증식율을 나타내었다(표 3). 따라서 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 골다공증 치료 또는 예방과 관련된 약물 및 건강식품에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[표 2]

농도(mg/ml) 약제	1×10^{-9}	1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}
NaF	-	-	113.52	112.62	92.02	102.93	103.56	-
E2	-	-	103.17	118.11	93.79	96.48	100.07	-
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	-	-	93.58	96.01	101.55	103.93	120.88	-
농도(mg/ml) 약제	2×10^{-7}	2×10^{-6}	2×10^{-5}	2×10^{-4}	2×10^{-3}	2×10^{-2}	2×10^{-1}	2×10^0
추출물 1	78.53	86.06	89.41	78.37	94.04	78.59	96.63	131.24
추출물 2	97.49	109.56	115.90	129.03	135.92	136.11	117.44	88.97
추출물 3	111.67	116.74	128.77	115.09	140.03	179.66	150.54	117.96
추출물 4	69.65	111.80	107.57	123.36	123.94	88.63	124.33	73.20
추출물 5	95.02	100.99	98.84	120.18	119.50	91.98	114.12	86.78
추출물 6	106.20	101.94	105.58	131.87	109.60	138.79	82.91	80.89
추출물 7	95.39	102.91	96.38	87.68	120.59	144.50	132.77	101.39
추출물 8	103.09	107.90	145.41	120.38	113.91	109.92	91.23	69.80
추출물 9	121.60	121.06	174.76	162.61	132.83	138.02	124.74	84.46

[표 3]

농도(mg/ml) 약제	1×10^{-9}	1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}
NaF	-	-	94.54	85.00	87.22	108.64	137.93	-
E2	-	-	98.69	108.07	112.31	113.98	116.57	-
1,25(OH) ₂ D ₃	-	-	117.14	126.83	136.50	116.91	85.88	-
농도(mg/ml) 약제	2×10^{-7}	2×10^{-6}	2×10^{-5}	2×10^{-4}	2×10^{-3}	2×10^{-2}	2×10^{-1}	2×10^0
추출물 1	127.14	113.11	110.01	118.01	125.85	114.25	85.77	120.43
추출물 2	100.47	119.41	113.67	120.75	133.82	125.33	107.04	124.05
추출물 3	112.80	129.58	103.40	127.81	139.73	141.09	130.70	126.65
추출물 4	109.24	117.26	146.94	133.98	156.03	144.65	110.78	168.72
추출물 5	145.56	129.92	138.94	146.55	124.53	128.38	140.46	160.52
추출물 6	96.39	109.12	116.15	108.79	106.09	112.26	91.62	141.41
추출물 7	108.32	110.87	114.97	112.98	125.75	115.29	148.21	162.92
추출물 8	111.81	93.20	101.10	114.64	84.84	125.16	96.88	114.39
추출물 9	124.53	114.85	100.87	102.03	103.01	94.30	141.41	113.04

< 1 - 3> ALP(alkaline phosphatase)의 활성 검색

조골세포는 ALP(alkaline phosphatase) 활성을 나타내므로, 본 발명의 혼합 생약재 추출물이 조골세포에서 ALP 활성에 미치는 영향을 하기와 같은 방법에 의해 알아보았다.

MTT 실험에서와 동일한 세포수의 Saos - 2 세포주에 시험 물질을 동일한 농도로 처리하고 동일한 조건에서 3일간 배양 후 수확하였다. 이 때, 비교군으로는 NaF, E2 및 1,25(OH)₂D₃ 등을 사용하였다. 한편, ALP가 p - 니트로페닐포스페이트(p - nitrophenylphosphate)를 p - 니트로페놀(p - nitrophenol)과 포스페이트(phosphate)로 분해시키는 것을 이용하여 405 nm에서의 흡광도의 변화를 이용하여 ALP 활성을 측정하였다.

그 결과, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 Saos - 2 세포에 대하여 우수한 ALP 활성률을 나타내었다(표 4 및 도 1). 따라서 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 조골세포의 세포수 뿐만 아니라 세포의 활성도 증가시켜 골의 생성을 촉진시킬 수 있으므로, 골다공증 치료 또는 예방과 관련된 약물 및 건강 식품에 유용하게 사용될 수 있다.

[표 4]

농도(mg/ml) 약제	1×10^{-9}	1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}
NaF	-	-	94.81	94.56	93.02	87.17	87.05	-
E2	-	-	96.18	100.92	98.71	90.85	91.03	-
1,25(OH) ₂ D ₃	-	-	192.15	93.92	99.51	182.73	167.46	-
농도(mg/ml) 약제	2×10^{-7}	2×10^{-6}	2×10^{-5}	2×10^{-4}	2×10^{-3}	2×10^{-2}	2×10^{-1}	2×10^0
추출물 1	109.57	113.71	112.96	109.03	118.07	114.13	113.92	78.86
추출물 2	104.2	106.11	94.22	105.68	108.53	106.63	101.92	146.21
추출물 3	102.08	94.82	97.95	102.41	97.00	116.11	106.71	114.43
추출물 4	93.10	94.12	87.48	84.41	99.78	103.22	103.80	48.03
추출물 5	97.43	91.76	81.98	79.10	80.16	93.46	84.06	33.60
추출물 6	127.34	117.30	138.72	121.54	119.08	112.54	109.33	111.78
추출물 7	85.53	65.64	76.62	70.95	84.88	107.87	85.59	125.76
추출물 8	103.13	88.25	84.46	80.70	85.35	105.79	96.76	127.68
추출물 9	95.56	117.11	92.65	93.59	80.56	90.36	107.52	139.16

< 실험예 2> 파골세포(osteoclast)의 세포증식 억제 실험

본 발명의 혼합 생약재 추출물이 파골세포(osteoclast)의 증식 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 본 발명자들은 골수세포(mouse bone marrow cell)와 ST-2 세포(ST-2 cell)를 공동 배양(coculture)하여 파골세포를 얻어 하기 와 같은 실험을 수행하였다.

< 2-1> 골수세포와 ST-2 세포의 공동 배양

< 2-1-1> 골수세포의 배양

ICR 마우스(대한실험동물, 충북, 음성)의 대퇴골(femur)과 경골(tibia) 주위의 근육 조직을 깨끗이 떼어 내고 대퇴골 과 경골을 분리하였다. 이것을 클린벤치(clean bench)로 옮기고, 미리 얼음에 넣어 두었던 10% FBS, 페니실린 100 유닛/ml와 스트렙토마이신 100 µg/ml을 포함하는 α-MEM(α-minimum essential medium, Gibco BRL, 미국) 배지에 대퇴골과 경골을 각각 넣었다. 대퇴골과 경골의 끝을 자르고 골수(bone marrow)가 완전히 빠질 때까지 배지를 씻어 내렸다. 원심분리하여 펠렛(pellet)을 얻고, 이것을 상기 배양 배지에 재부유시켜 배양 플라스크에 분주한 후, 37 °C, 습식 조건인 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 점착되지 않은 세포들을 수집하여 프로나제(pronase) 용액에 재부 유시켜 37°C에서 반응시켰다. 원심분리한 후, 침전된 세포를 상기 배양 배지에 부유시켜 ST-2 세포와의 공동 배양에 사용하였다.

< 2-1-2> ST-2 세포의 배양

ST-2 세포는 RIKEN 세포 은행(Tsukuba, 일본)에서 분양 받아 사용하였다. 10% FBS, 100 유닛/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 RPMI 1640 배지를 사용하여, 37°C에서 습식 조건인 5% CO₂ 배양기를 이용하여 ST-2 세포를 배양하였다. 배지는 1주일에 2-3회 교환하였고, 1주일에 1회 계대배양하였다. ST-2 세포는 배양 플라 스크에 단일층을 형성하며 자라는 특성이 있기 때문에, 계대배양시에는 0.25% 트립신 용액으로 단일층을 벗겨 내었다.

< 2-1-3> 골수 세포와 ST-2 세포의 공동 배양

ST-2 세포를 트립신으로 처리하여 10% FBS를 포함하는 α-MEM 배지에 부유시켰다. 96-웰 플레이트에 상기 ST-2 세포 부유액을 5×10^4 세포수/cm² 씩 가하여 24시간 동안 배양하였다. 점착하지 않는 골수 세포를 5×10^5 세포수 /cm² 씩 ST-2 세포가 들어 있는 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 공동 배양 배지로는 10% FBS, 10^{-8} M 1,25(OH)₂D₃, 10^{-7} M 덱사메타손(dexamethasone)을 포함하는 α-MEM의 배지를 사용하였다. 배지는 1주일에 2회 교환하였 다.

< 2-2> 파골세포(osteoclast)의 세포증식 억제 실험

골수 세포와 ST-2 세포를 공동 배양한 지 7일 째에 상기 추출물 1 내지 추출물 9를 처리한 후 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) 염색하여 다핵 세포(multinucleated cell)의 수를 세어 측정하였다. 염색은 시판되는 키트(Sigma사, 미국)를 사용하였으며, 3개 이상의 핵을 갖는 TRAP-양성 세포(TRAP-positive MNC)를 파골세포로 측정하여 대조군 세포에 대한 %로 나타내었다.

그 결과, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 파골세포의 세포증식 억제 효과가 있는 것으로 나타났다(표 5 및 도 2).

[표 5]

농도(mg/ml) 약재	2×10^{-4}	2×10^{-3}	2×10^{-2}	2×10^{-1}	2×10^0
추출물 1	84.42	91.40	41.86	65.58	-
추출물 2	95.90	-	62.77	-	45.75
추출물 3	100.10	100.75	87.35	88.00	-
추출물 4	97.4	137.9	151.8	122.6	62.9
추출물 5	135.0	144.9	138.5	100.0	68.0
추출물 6	73.9	89.6	56.8	50.7	48.6
추출물 7	98.52	106.39	92.73	89.10	-
추출물 8	97.41	107.9	91.83	87.56	72.9
추출물 9	120.72	94.71	98.32	88.93	82.46

또한, 본 발명자들은 파골세포의 증식억제 실험에서 TRAP 분석 후 5% 소듐 하이포클로리트(sodium hypochlorite) 용액을 5분간 처리하여 플레이트에 붙어있는 세포들을 제거하였다. 이미지 분석기를 사용하여 플레이트내의 골조직의 소실정도를 측정하기 위하여 피트(pit)의 면적을 측정하고 대조군 웰의 피트 면적에 대한 시료첨가군의 피트 면적의 %로 나타내었다.

그 결과, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 파골세포의 세포증식 억제 효과가 있는 것으로 나타났다(표 6). 즉, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 조골세포의 활성을 증가시킴과 동시에 파골세포의 활성을 억제하는 것으로 나타나 골다공증의 예방 및 치료제로서 이상적인 제제라고 사료된다.

[표 6]

농도(mg/ml) 약재	2×10^{-4}	2×10^{-3}	2×10^{-2}	2×10^{-1}	2×10^0
추출물 1	87.3	95.1	78.4	72.5	-
추출물 2	94.0	-	63.6	-	52.8
추출물 3	93.9	98.2	71.8	84.0	-
추출물 4	69.4	117.6	67.9	99.1	77.8
추출물 5	141.6	91.3	113.1	74.5	39.9
추출물 6	80.3	102.9	81.9	51.7	47.2
추출물 7	101.7	99.5	104.0	97.3	-
추출물 8	96.3	100.2	89.3	86.7	78.0
추출물 9	117.1	97.9	93.2	83.9	76.4

< 실험예 3> 골다공증 모델의 동물 실험난소 적출 환경에 대한 동물 실험

본 발명자들은 골다공증에 대한 동물 실험을 하기 위해 폐경기 이후 타입 I(type I) 골다공증이 일어나는 SD(Sprague-Dawley)계 흰쥐의 암컷을 대상으로 하여 난소적출 실험을 하고 타입 II 골다공증이 일어나는 SAM P6 생쥐를 대상으로 하여 소주골 면적의 변화를 측정하였다.

< 3-1> 난소 적출술 및 약물 투여

실험 재료로는 생후 10주된 체중 200~300 g 정도의 암컷 흰쥐 (Sprague Dawley rat)를 사용하였다. 난소 적출술은 sham(sham)군(정상군)을 제외하고 대조군과 시험군의 모든 흰쥐 암컷에서 양측 난소 적출술을 시행하였다. 케타민(ketamine; 유한양행, 대한민국) 5 mg/100 g과 자일라진(xylazine; 한국바이엘, 대한민국) 1 mg/100 g을 흰쥐의 좌측 및 우측 후지 대퇴근에 근육 주사하여 흰쥐 암컷을 전신 마취시켰다. 정중선(백선)을 중심으로 하복부를 절개하고, 좌우 난소를 적출하였다. 항생제(셀파포르테 - 4, 유니화학 주식회사) 0.3 ml을 복강 내에 주입하여 감염을 방지하였으며, 전사 및 나일론사로 복막, 복근 및 피부를 봉합하였다.

sham(sham)군은 난소 적출을 제외한 모든 수술을 행한 동물들로 난소를 적출하고 약물 투여를 하지 않은 대조군에 대한 비교군으로 난소 적출로 인한 변화를 대조군과 비교하기 위하여 존재한다. 반면에 대조군은 난소 적출술을 행하고 약물 투여를 실시한 투여군들의 동물들과 비교하여 약물 투여에 기인하는 변화를 비교하기 위한 것이다. 난소를 적출하고 나서 1주 후부터 삼군과 대조군은 음용수를 경구투여하였고, E2군은 17 β - 에스트라디올을 1 μ g/kg/day로 복강주사하였다. 또한, 본 발명의 추출물 1 내지 9를 5 g/kg/day로 9주간 경구투여하고, 약물의 성분인 제니스테인(genistein)은 10 mg/kg/day로 9주간 복강 주사하였다.

< 3-2> 약물투여에 의한 체중 및 조직무게의 변화 측정

상기 방법에 의해 난소가 적출된 후 약물이 투여된 실험동물의 체중을 매주 측정하고 일정기간 투여 후 조직무게를 측정하여 난소 적출을 제외한 모든 수술을 행한 sham군 및 난소를 적출하여 본페로니 다중 비교법(bonferroni multiple comparison method)으로 약물 투여를 하지 않은 대조군의 체중 및 조직무게와 비교하였다.

그 결과, 제니스테인 투여시 대조군과 비교하여 체중의 변화나 자궁무게의 차이는 나타나지 않았다. 즉 체중의 변화나 자궁무게의 변화를 나타낼 만큼 큰 호르몬의 변화는 없는 것으로 사료되며, E2군이 부작용으로 자궁비대가 나타난 반면 본 발명의 추출물은 상기와 같은 증상이 나타나지 않아 안전한 약물로 사료된다(표 7, 표 8, 도 3).

[표 7] 약물투여에 의한 실험동물의 체중변화

주령	대조군	삼군	E2	추출물 1
10	237.49 \pm 7.41	233.29 \pm 5.71	244.97 \pm 8.06	256.75 \pm 8.32
11	256.74 \pm 6.10	242.99 \pm 5.35	262.41 \pm 6.91	256.65 \pm 7.13
12	285.14 \pm 6.03**	251.69 \pm 5.52#	272.33 \pm 7.13	281.93 \pm 8.50*
13	310.79 \pm 5.94**	260.17 \pm 5.64##	281.00 \pm 6.30	308.76 \pm 9.36**
14	326.45 \pm 7.09**	270.05 \pm 6.76***	293.05 \pm 7.74**	324.62 \pm 10.38**
15	336.18 \pm 7.97**	275.66 \pm 5.70***	302.64 \pm 8.78**	330.18 \pm 12.19**
16	345.38 \pm 7.95**	278.34 \pm 6.46***	299.82 \pm 7.76**	339.76 \pm 12.60**
17	343.13 \pm 8.12**	282.68 \pm 7.31***	306.27 \pm 8.47**	342.91 \pm 11.95**
18	357.26 \pm 8.58**	285.88 \pm 6.72***	308.97 \pm 8.56**#	346.71 \pm 11.77**
19	364.77 \pm 8.59**	292.07 \pm 6.83***	319.14 \pm 9.06**	348.82 \pm 11.34**
20	371.21 \pm 8.45**	300.32 \pm 6.95***	327.96 \pm 8.22**	356.27 \pm 11.87**

10주령과 비교하여 *: p < 0.05, **: p < 0.01,

대조군과 비교하여 #: p < 0.05, ##: p < 0.01

[표 8]

	경골	요추골
대조군	100.0±7.6	100.0±3.4
삼군	247.1±15.3**	138.8±7.8**
E2군	148.5±6.6*	132.0±4.2**
제니스테인 군	137.6±6.0*	128.2±4.4*
추출물 1	137.2±8.3*	100.9±3.8
추출물 2	134.7±7.9	126.0±6.8
추출물 3	132.5±10.0	120.9±4.0
추출물 4	147.5±4.9**	131.4±4.4**
추출물 5	142.1±6.2*	128.0±4.8*
추출물 6	133.9±7.2	121.8±5.0
추출물 7	132.0±4.8	124.4±4.2
추출물 8	139.4±6.6*	128.8±2.6**
추출물 9	140.8±7.2*	130.0±3.8**

10주령과 비교하여 *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$

< 3-3> 병리조직학적 관찰

채취한 대퇴골 조직을 10% 포르말린 용액에 고정한 후 포름산 내에서 탈회를 실시하였다. 골조직의 관찰 부위를 수술 칼로 절단한 뒤 70~100% 알코올과 아세톤에 이르는 단계별 탈수 과정을 거쳐 자일렌으로 청명하고 파라핀 포매를 실시하였다. 파라핀 포매된 골조직을 마이크로톰으로 5 μm 로 절단하고 헤마톡실린 및 에오신(hematoxyline & eosin, H & E) 염색을 실시하고, 광학 현미경으로 관찰하였다.

그 결과, 각 군의 골조직 간에 병리학적인 차이는 관찰되지 않았으므로 시험 약물의 투여로 인한 생체 내 독성은 없는 것으로 판단되었고, 각 군의 골조직의 소주골 증감을 나타내는 경골 골조직 단면사진을 보면 대조군에 비해 혼합 생약재 추출물의 투여군에는 소주골이 많이 존재함을 확인하였다(도 4).

< 3-4> 형태계측학적 분석

각 군의 요추골 및 경골에서 하기와 같은 방법에 의해 형태계측학적 분석을 실시하였다. 정량적 영상 분석기(Quantitative image analysis system, Wild Leitz Co.)의 디지털화 장치(digitizer)로 요추골 및 경골부에서 각 소주의 면적을 자동적으로 계산하고 이것으로 소주골(trabecula)의 면적을 구하였다. 각 경골의 근위부에서 성장판의 직하부의 부분 중 가로변의 길이가 성장판 길이의 약 2/3정도 되는 길이로 기준 면적 $2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 인 직사각형의 내부에 있는 소주골의 평균 면적을 구하고, 그 직사각형 내부의 골소주의 개수를 구한 다음 평균 면적에 개수를 곱하여 각각의 골 표본의 소주골 면적을 구한 후 통계 처리하였다.

그 결과, 난소 적출한 대조군은 정상 상태(삼군)에 비해 소주골의 면적이 50% 정도 감소되었으며, 이는 골다공증이 유발되었음을 나타내는 것이다. 또한, 난소 적출로 인한 소주골 면적은 E2나 혼합 생약재 추출물 특히 추출물 1의 투여로 인해 증가되었는데, 정상군인 삼군에 비해서는 낮았으나($P < 0.01$) 대조군에 비해서는 유의성 있게 증가하였다($P < 0.05$). 본 발명의 혼합 생약재 추출물의 투여는 대조군에 비해 약 40% 정도 소주골의 면적을 증가시켰다(도 5). 따라서 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 골다공증의 예방 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 알수 있다.

< 3-5> 소주골 면적 실험

본 발명자들은 김정숙 등의 한약이 난소제거 흰쥐와 SAM P6 생쥐의 골소주에 미치는 영향에 관한 참고문헌(김정숙 등, 약학회지, 1998, 42, 220-228)에 의거하여 의해 타입 II 골다공증이 일어나는 SAM P6 생쥐를 대상으로 하여 본 발명의 추출물을 투여한 뒤 소주골 면적의 변화를 측정하였다. 구체적으로 본 발명의 추출물 1 내지 추출물 9는 5 g/kg/day로 경구 투여하고, 대조군은 아무 것도 투여하지 않는 조건으로 투여한 뒤 소주골의 면적을 측정하였다.

그 결과, 14일간 추출물을 투여한 군은 투여전에 비해 평균 소주골 면적(도 6) 및 총 소주골 면적이 증가되었으며(도 7), 30일간 추출물을 투여한 군은 30일째의 대조군이나 투여전에 비해 평균 소주골 면적이 증가되었으며(도 6), 총 소주골 면적도 30일째의 대조군에 비해 상승하였다(도 7).

< 실험예 4> 랫트에 대한 경구투여 급성 독성실험

6주령의 특정병원체부재(specific pathogen - free, SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 군당 2 마리씩의 동물에 본 발명의 혼합 생약재 추출물을 각각 0.5% 메틸셀룰로즈 용액에 현탁하여 1 g/kg/ml의 용량으로 1회 단회 경구투여 하였다. 시험물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다.

그 결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검조건 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 따라서, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 모두 랫트에서 10 g 추출물/kg까지도 독성변화를 나타내지 않으며 경구 투여 최소치사량(LD₅₀)은 추출물 10 g/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 조골세포(osteoblast)를 증식시키고 파골세포(osteoclast)의 증식을 억제하는 활성을 갖기 때문에, 골다공증, 퇴행성골질환 및 류마티스 관절염과 같은 골질환 등의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 독성이 전혀 없으므로 건강 보조 식품으로도 널리 이용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기 (a)군 및 (b)군에서 각각 선택된 하나 또는 그 이상으로 혼합한 혼합 생약재를 물, 알콜 또는 알콜수용액으로 추출한 추출물.

(a) 감초, 진피, 황기, 대추, 인동, 구기자, 두충, 금은화 및 백하수오;

(b) 흑두(또는 대두), 약콩(귀눈이콩, 서목태), 작두콩 및 백편두

청구항 2.

제 1항에 있어서, 혼합 생약재는 하나 또는 그 이상의 하기 (c)군의 생약재 및/또는 녹용을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 추출물.

(c) 승마, 우방자, 상엽(뽕나무잎), 갈근, 시호, 소엽, 팥향 및 계피

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 감초 2 중량부, 흑두 2 중량부 및 승마 1 중량부로 혼합하는 것을 특징으로 하는 추출물.

청구항 4.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 황기 5 중량부 및 약콩 5 중량부로 혼합하는 것을 특징으로 하는 추출물.

청구항 5.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 황기 5 중량부 및 녹용 5 중량부로 혼합하는 것을 특징으로 하는 추출물.

청구항 6.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 황기 4 중량부, 백하수오 4 중량부, 약콩 4 중량부, 녹용 1 중량부 및 계피 0.5 중량부로 혼합하는 것을 특징으로 하는 추출물.

청구항 7.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 황기 4 중량부, 백하수오 4 중량부 및 약콩 4 중량부, 계피 0.5 중량부로 혼합하는 것을 특징으로 하는 추출물.

청구항 8.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 황기 8 중량부, 약콩 8 중량부 및 계피 1 중량부로 혼합하는 것을 특징으로 하는 추출물.

청구항 9.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 황기 1 중량부, 백하수오 1 중량부 및 약콩 1 중량부로 혼합하는 것을 특징으로 하는 추출물.

청구항 10.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 황기 8 중량부, 약콩 8 중량부, 백편두 8 중량부 및 계피 1 중량부로 혼합하는 것을 특징으로 하는 추출물.

청구항 11.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 황기 8 중량부, 백하수오 8 중량부, 약콩 8 중량부, 백편주 8 중량부 및 계피 1 중량부로 혼합하는 것을 특징으로 하는 추출물.

청구항 12.

제 1항에 있어서, 알콜수용액은 5 내지 100%의 에틸알콜(ethyl alcohol), 5 내지 100%의 메틸알콜(methyl alcohol) 및 주정으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 추출물.

청구항 13.

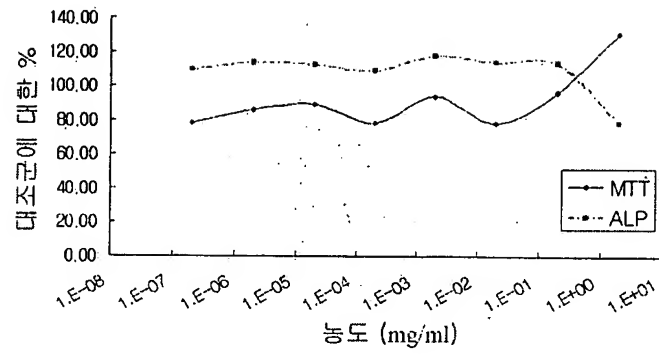
제 1항의 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14.

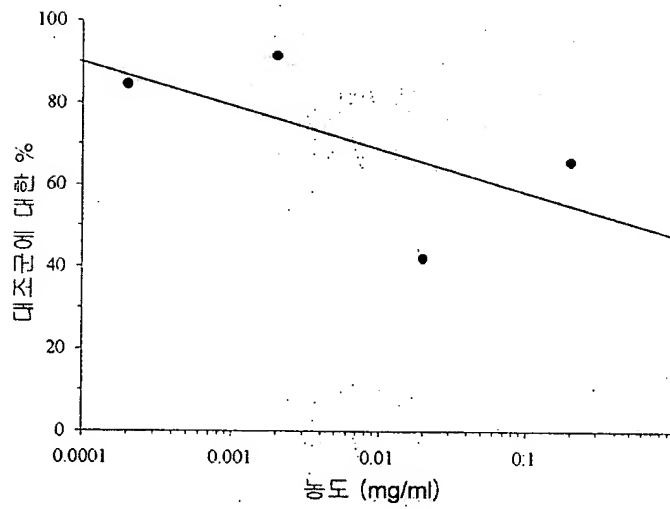
제 1항의 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 건강식품.

도면

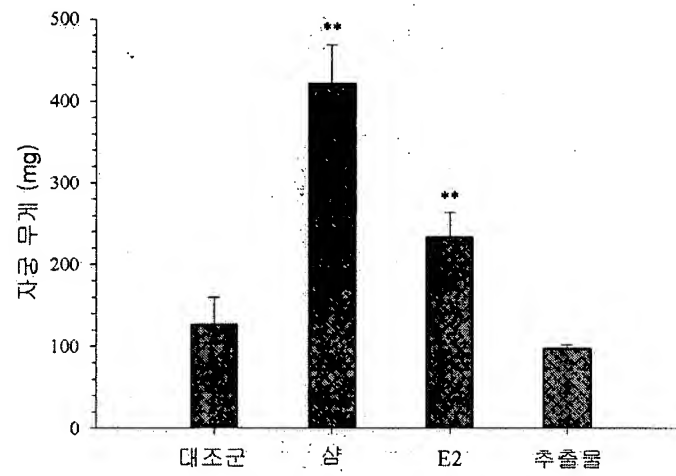
도면 1



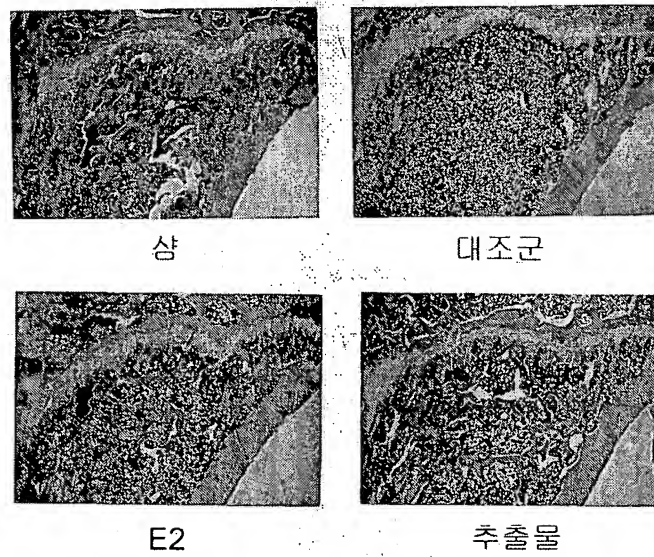
도면 2



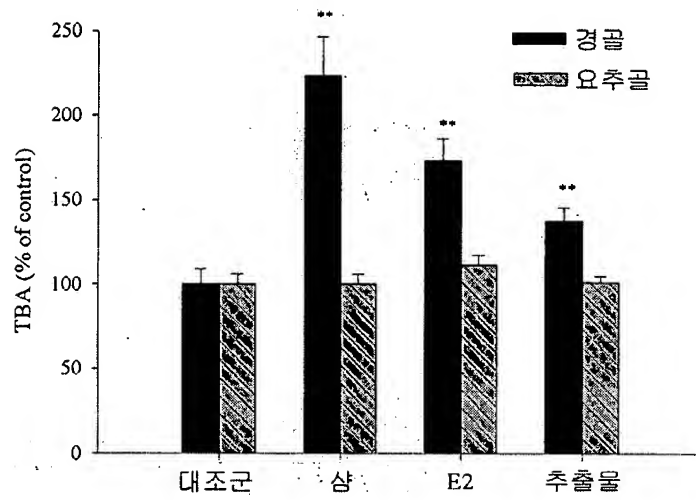
도면 3



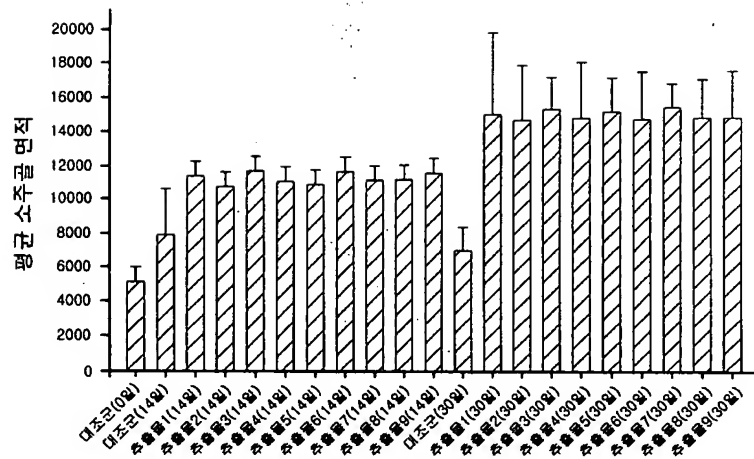
도면 4



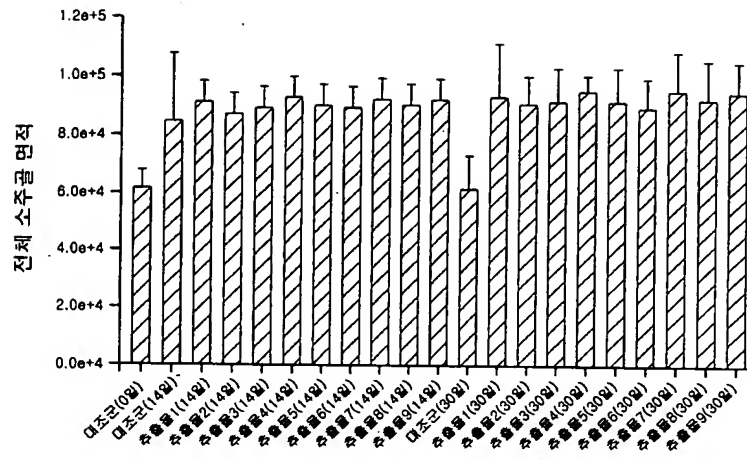
도면 5



도면 6



도면 7



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.